

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/00554 (43) Date de publication internationale: 6 janvier 1994 (06.01.94)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00618</p> <p>(22) Date de dépôt international: 22 juin 1993 (22.06.93)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 92/07632 23 juin 1992 (23.06.92) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - I.N.R.A. [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : DEQUIN, Sylvie [FR/FR]; 7, rue du Général-René, F-34000 Montpellier (FR). BARRE, Pierre [FR/FR]; 90, rue des Lavandes, F-34980 S.-Gely-du-Fesc (FR).</p>		<p>(74) Mandataires: ORES, Irène etc. ; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(81) Etats désignés: CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>
<p>(54) Title: YEAST STRAINS EXPRESSING A LACTIC LACTICODESHYDROGENASE GENE AND VECTORS USEFUL IN PRODUCING SAID STRAINS</p> <p>(54) Titre: SOUCHES DE LEVURE EXPRIMANT LE GENE DE LA LDH LACTIQUE, ET VECTEURS UTILISABLES POUR L'OBTENTION DESDITES SOUCHES</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Yeast strains containing at least one copy of a gene encoding a lactic bacteria lacticodeshydrogenase, under the control of sequences regulating the expression of said gene in the yeast. The invention also encompasses expression vectors for use in producing said yeast strains.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention est relative à des souches de levure contenant au moins une copie d'un gène codant pour une LDH de bactérie lactique, sous contrôle de séquences régulant l'expression dudit gène dans la levure. L'invention englobe également des vecteurs d'expression utilisables pour l'obtention desdites souches de levure.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NE	Niger
BE	Belgique	GN	Guinée	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NO	Norvège
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IE	Irlande	PL	Pologne
BR	Brsil	IT	Italie	PT	Portugal
BY	Bélarus	JP	Japon	RO	Roumanie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KR	République de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SE	Suède
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	République slovaque
CM	Cameroun	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
CN	Chine	LV	Lettonie	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	MC	Monaco	TC	Togo
CZ	République tchèque	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DE	Allemagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
DK	Danemark	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
ES	Espagne			VN	Viet Nam
FI	Finlande				

SOUCHES DE LEVURE EXPRIMANT LE GENE DE LA LDH LACTIQUE,
ET VECTEURS UTILISABLES POUR L'OBTENTION DESDITES
SOUCHES.

L'Invention est relative à la construction de
5 levures exprimant une fermentation mixte alcoolique-
lactique.

Ces deux grands types de fermentation des
sucres sont traditionnellement mis en oeuvre dans
l'industrie agro-alimentaire : la fermentation alcoo-
10 lique, dont sont responsables des levures du genre
Saccharomyces, conduit pour l'essentiel à la formation
d'éthanol et de CO₂ ; et la fermentation lactique
(bactéries lactiques) conduit à la formation d'acide lac-
tique.

15 La fermentation alcoolique et la fermentation
lactique présentent des voies métaboliques pratiquement
superposables jusqu'au pyruvate. A ce stade, cet intermé-
diaire est traité différemment par deux systèmes accep-
teurs finaux d'électrons. Dans la fermentation alcoo-
20 lique, le pyruvate est décarboxylé en acétaldéhyde, ce
dernier composé étant réduit en éthanol par le biais
d'une alcool déshydrogénase ; dans la fermentation
lactique, le pyruvate est réduit directement en lactate
par le biais d'une lactico-déshydrogénase (LDH).

25 Les microorganismes utilisés en agro-alimen-
taire possèdent l'une ou l'autre de ces deux voies méta-
boliques et accomplissent de manière exclusive l'une ou
l'autre de ces deux fermentations.

Les Inventeurs ont entrepris de construire une
30 souche de levure pouvant accomplir à la fois la fer-
mentation alcoolique et la fermentation lactique, ce qui
résulte en une fermentation à bilan intermédiaire entre
ces deux types..

Le principe de la construction réalisée par
35 les Inventeurs a consisté à cloner le gène d'une lactico-
déshydrogénase d'une bactérie lactique GRAS
(*Lactobacillus casei*) et à faire exprimer ce gène chez

Saccharomyces pour y installer, en bout de flux carboné, un système accepteur d'électrons devant concurrencer le système sauvage.

Une telle construction n'avait jamais été proposée dans l'art antérieur, car il était généralement admis que trois grands groupes d'obstacles pouvaient faire échec à son fonctionnement :

- une expression nulle ou insuffisante du gène bactérien chez *Saccharomyces* ;
- 10 - un fonctionnement non concurrentiel du système accepteur introduit ;
- une incompatibilité entre le fonctionnement du système et la viabilité et l'activité fermentaire de *Saccharomyces*, résultant par exemple d'un problème de
- 15 translocation membranaire du lactate.

Or, de façon surprenante, les Inventeurs sont parvenus à obtenir un système viable et fonctionnel, et conduisant au détournement d'une part importante du flux carboné vers le lactate.

20 La présente Invention a pour objet des souches de levure caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins une copie d'un gène codant pour une LDH de bactérie lactique, sous contrôle de séquences régulant l'expression dudit gène dans la levure.

25 Par "séquences régulant l'expression d'un gène" on entend des séquences de type promoteur et terminateur actives dans la levure. Les promoteurs et terminateurs de différents gènes peuvent être utilisés, associés dans des combinaisons différentes. On citera, à titre

30 d'exemple non limitatif, les promoteurs et terminateurs, connus en eux-mêmes, des gènes alcool-déshydrogénase I (ADHI), phosphoglycérate kinase (PGK), et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH).

35 L'invention comprend également la cassette d'expression obtenue en associant lesdites séquences de régulation et le gène de la LDH ; cette cassette peut

être portée par un plasmide, ou intégrée dans l'ADN chromosomique de la levure hôte.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente Invention, lesdites levures appartiennent au genre
5 *Saccharomyces*.

Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente Invention, le gène exprimé est celui de la LDH de *Lactobacillus casei*.

Pour que le gène intégré s'exprime dans la
10 levure, le codon d'initiation GTG est préalablement modifié en ATG.

L'Invention englobe également des vecteurs d'expression, comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus, et utilisables pour l'obtention
15 des souches de levure transformées conformes à l'Invention.

Ces vecteurs pourront être sélectionnés sur la base de la nature et de la force des éléments régulateurs qui entrent dans la cassette d'expression. On peut choisir
20 les promoteurs et terminateurs décrits plus haut, ou toute autre séquence permettant de contrôler l'expression d'un gène dans la levure.

Un autre critère du choix des vecteurs réside dans le nombre de copies de ceux-ci, qui est conditionné
25 par le choix de l'origine de répllication.

On peut choisir d'intégrer le gène de la LDH, muni de ses séquences de contrôle, dans le génome de la levure, auquel cas on pourra par exemple choisir un vecteur intégratif (YIp) ne possédant pas d'origine de
30 répllication dans la levure ; il est également possible d'intégrer ce gène en utilisant d'autres techniques, par exemple la co-transformation.

S'il est préférable que le gène de la LDH soit porté par un plasmide, un choix peut être fait entre les
35 vecteurs suivants :

. Vecteur répllicatif (YEp) à haut nombre de

copies, possédant comme origine de répllication dans la levure une partie du plasmide 2 μ endogène.

. Vecteur répllicatif (YRp) à haut nombre de copies, possédant comme origine de répllication une sé-
5 quence ARS chromosomique.

. Vecteur répllicatif (YLp) linéaire à haut nombre de copies possédant des séquences télomériques comme origine de répllication.

. Vecteur répllicatif (YCp) à bas nombre de
10 copies, possédant une séquence ARS chromosomique et une séquence centromérique.

Préférentiellement, les vecteurs conformes à l'Invention comportent également des marqueurs de sélection dans la levure, tels que des marqueurs
15 d'auxotrophie : URA₃, LEU₂, HIS₃, TRP₁, ADE, etc ...et/ou des marqueurs de résistance à des antibiotiques (G418, hygromycine B, chloramphénicol, phléomycine), à des herbicides (sulfométuron methyl), au cuivre, etc...

Avantageusement, les vecteurs conformes à
20 l'Invention sont des vecteurs navette, possédant également une origine de répllication bactérienne et un marqueur de sélection dans une bactérie (par exemple, gène de résistance à un antibiotique).

Les plasmides conformes à l'Invention, portant
25 le gène codant pour la LDH d'une bactérie lactique peuvent être introduits dans toutes souches de levure, par différentes techniques de transformation.

Parmi les techniques de transformation les plus courantes, on citera la technique des protoplastes,
30 la technique de perméabilisation aux sels de lithium et l'électroporation.

Il est possible de moduler le taux d'expression du gène codant pour la LDH, et en conséquence le rapport éthanol-lactate, en jouant notamment sur le
35 nombre de copies du gène LDH introduites dans la levure,

et/ou sur la force des éléments de régulation qui y sont associés.

La construction de différentes souches conformes à l'invention, exprimant la LDH à des degrés divers, peut être réalisée selon l'utilisation recherchée, qui détermine le rapport éthanol/lactate souhaité.

Dans tous les cas, le procédé de cette construction comprend les étapes suivantes :

- construction d'une cassette d'expression
10 comprenant le gène LDH et des éléments régulateurs de force variable, selon le rapport éthanol/lactate souhaité ;

- introduction de cette cassette soit en monocopie, soit en multicopie (selon le rapport
15 éthanol/lactate souhaité) dans la levure.

Les souches de levure conformes à l'invention trouvent de nombreuses applications dans l'agro-alimentaire. Elles sont utilisables partout où une fermentation alcoolique doit s'accompagner d'une acidification biologique (par exemple élaboration de cidre à partir de
20 pommes insuffisamment acides, élaboration de pâtes à pain dites acides, produits lactés type kéfir ...), ou d'un abaissement de son rendement en éthanol.

Ceci est particulièrement intéressant dans le
25 domaine de l'oenologie :

- pour palier au manque d'acidité d'un nombre de plus en plus important de vins, notamment dans les régions chaudes ;

- pour pouvoir bénéficier des avantages de la
30 fermentation malolactique (stabilisation biologique du produit) même lorsqu'elle conduit à une désacidification trop poussée, en compensant par une acidification ;

- pour produire des vins ou des boissons à teneur allégée en éthanol.

35 En outre, en poussant la déviation de la fermentation alcoolique à son extrême, des levures Saccharo-

myces transformées conformément à l'Invention permet-
traient de remplacer les bactéries pour réaliser la fer-
mentation lactique. Ces levures présenteraient les avan-
tages suivants : insensibilité aux phages, croissance en
5 milieu pauvre en nutriments, croissance en milieu acide,
croissance à température plus basse. Elles pourraient
également être mises en oeuvre pour la production indus-
trielle d'acide lactique.

La présente Invention sera mieux comprise à
10 l'aide du complément de description qui va suivre, qui se
réfère à des exemples de construction de souches de
levure transformées conformes à l'Invention, ainsi qu'à
la démonstration de leur activité fermentaire.

Il va de soi toutefois que ces exemples sont
15 donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de
l'Invention, dont ils ne constituent en aucune manière
une limitation.

EXEMPLE 1 : CLONAGE DU GENE DE LA L-LDH DE *L. CASEI*

A) Construction d'une banque d'ADN de *L. casei*
20 dans *E. coli*

a) Extraction de l'ADN de *L. casei*

La souche *Lactobacillus casei* ATCC 393 a été
utilisée. Elle a été cultivée sur milieu MRS dont la com-
position est la suivante : polypeptone 10 g/l, extrait de
25 levure 5 g/l, extrait de viande 10 g/l, glucose 2 g/l,
phosphate dipotassique 2 g/l, acétate de sodium 5 g/l,
citrate d'ammonium 2 g/l, sulfate de magnésium 0,2 g/l,
sulfate de manganèse 0,05 g/l, tween 80 1ml/l.

15 ml de milieu MRS sont ensemencés par *L.*
30 *casei* et incubés à 37°C pendant une nuit. 500 ml de même
milieu sont ensemencés par les 15 ml de préculture ainsi
obtenus, et incubés à 37°C avec légère agitation jusqu'à
une DO (550 nm) de 3,9.

L'ADN est extrait selon LERCH et al. [Yeast,
35 7:253-263, (1989)] et purifié sur gradient de chlorure de
césium en présence de bromure d'éthidium [MANIATIS et

al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

Le bromure d'éthidium est extrait à l'isobutanol (2 fois) et à l'alcool isoamylique (2 fois). Après
5 dilution par 2 volumes d'eau, l'ADN est précipité par 6 volumes d'éthanol.

Le précipité est récupéré à la baguette et dissous dans 2 ml de TE (Tris 10 mM EDTA 1 mM pH 7.5).

La concentration de l'ADN en solution est
10 déterminée par mesure de la DO à 260 nm.

b) Digestion de l'ADN de *L. casei*

60 µg d'ADN de *L. casei* sont digérés partiellement par 8 unités d'enzyme Sau3A pendant 40 mn à 37°C.

Le mélange est extrait au phénol, phénol-
15 chloroforme, chloroforme et précipité à l'alcool.

Après centrifugation, l'ADN est repris dans 300 µl de TE et les fragments séparés sur gradient de sucrose pendant 15 heures à 25000 rpm.

Des fractions de 0,5 ml sont récoltées et analysées sur gel d'agarose 0,8%. La fraction contenant des
20 fragments de 2 à 4 kb est dialysée contre du TE pendant 4 heures.

c) Ligation de l'ADN digéré au vecteur pUC18

L'ADN digéré est ensuite ligué au vecteur
25 pUC18Bam HI déphosphorylé (Appligène), pour la réalisation de la banque, dans les conditions suivantes :

pUC18BdP	5 µl (250 ng)
ADN digéré	10 µl (1 µg)
APPLIGENE Tp Ligation 5X	10 µl
30 APPLIGENE Ligase	5 µl
Eau	20 µl

Le mélange est incubé pendant 18 h à 14°C

d) Transformation de *E. coli*

La souche de *E. coli* DH5α (GIBCO BRL) de génotype : F⁻ ; endA1 ; hsdR17(K⁻, mK⁻) ; supE44 ; Thi-1 ;
35 λ⁻ ; recA1 ; gyrA96 ; relA1, a été utilisée.

Les protocoles utilisés pour la préparation des bactéries compétentes et ceux pour la transformation sont décrits par HANAHAN [In DNA cloning, vol. 1 DM Glover (ed) IRL Press, 109-135 (1985)].

- 5 Le mélange de ligation a été utilisé pour transformer les bactéries compétentes DH5 α . Les colonies obtenues ont été sélectionnées sur boîte LB (bactotryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l, NaCl 10g/l) + ampicilline (50 μ g/ml). 92% des clones avaient un insert
10 de la taille attendue (2-4 kb).

B. - Amplification d'un Fragment du gène LDH par PCR

- A partir de la séquence protéique de la L-LDH de *Lactobacillus casei* publiée par HENSEL et al. [Eur. J. Biochem 134:503-511, (1983)], deux mélanges
15 d'oligonucléotides ont été synthétisés. L'amorce 4122 est dérivée des acides aminés 5 à 10 : Asp-Lys-Asp-His--Gln-Lys et l'amorce 5036 est dérivée des acides aminés 262 à 267 : Tyr-Met-Asp-Gly-Gln-tyr (Kim et al. 1991).

- 20 4122 :
5' -GA(C,T) -AA(G,A) -GA(C,T) -CA(C,T) -CA(G,A) -A-(A) -3'
5036 :
5' -TA-(C,T)TG-(ACTG)CC-(G,A)TC-CAT-(G,A)TA-3'

- Les 2 amorces ont été utilisées pour amplifier
25 un fragment du gène de la L.LDH de *L. casei* à partir de l'ADN total isolé de cette souche ; la taille du fragment amplifié est de 785 paires de bases. L'amplification a été réalisée comme suit :

- | | |
|----------------|--------------------------|
| Amorce 4122 | 5 μ l (100 pmoles) |
| 30 Amorce 5036 | 7,2 μ l (100 pmoles) |
| Taq Buffer 10X | 10 μ l |
| Taq (BECKMAN) | 0,5 μ l |
| 5u/ μ l | |
| dNTP (2 mM) | 10 μ l |

ADN *L. casei* 10 μ l (100 ng)
(10ng/ μ l)

Eau 57 μ l

Taq buffer 10X : Tris HCl pH 8,3 100mM, KCl 500mM, MgCl₂
5 15mM

Conditions d'amplification : 1 mn 94°C, 1mn 55°C, 2 mn
72°C pendant 30 cycles, sur amplificateur PHC2 TECHNE.

Le produit d'amplification est analysé sur gel
d'agarose 1,5% et la bande correspondante (785 bp) préle-
10 vée. L'ADN est élué sur colonne MILLIPORE ULTRAFREE,
purifié par extractions classiques au phénol précipité à
l'alcool, puis centrifugé et repris dans du tampon TE.

C. - Criblage de la banque

a) Marquage du fragment de 785 bp

15 Le fragment amplifié est marqué au ³²P par la
technique multiprime, à l'aide du kit "Rapid hybridiza-
tion system multiprim" (AMERSHAM). L'ADN est dénaturé à
100°C pendant 3 mn puis refroidi brutalement dans la
glace. Le marquage est effectué dans les conditions sui-
20 vantes :

	ADN 785 bases	12 μ l (100 ng)
	tampon de marquage	10 μ l
	hexanucléotides	5 μ l
	dCTP (32P)	4 μ l
25	(3000 ci/nmoles)	
	Klenow	2 μ l
	H ₂ O	17 μ l
	pendant 2 heures à 37°C.	

La sonde marquée est séparée des nucléotides
30 par filtration sur colonne NENSORB (NEN). La radioacti-
vité des fractions éluées est déterminée par comptage au
compteur à scintillation.

b) Préparation des filtres

Après transformation des bactéries DH5 α par un
35 aliquot du mélange de ligation constituant la banque,
4000 clones Amp^r ont été obtenus sur boîtes LB +

ampicilline, ce qui représente environ 3 fois la taille du génome.

Les colonies bactériennes sont transférées sur membrane de nylon (HYBOND N, AMERSHAM) et l'ADN dénaturé, selon la technique de GRUNSTEIN and HOGNESS [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961-3965 (1975)]. Les membranes sont ensuite incubées 2 heures à 80°C.

c) Hybridation

L'hybridation est réalisée à l'aide du kit "Rapid hybridization system multiprim" selon le protocole décrit par le fournisseur (AMERSHAM). Les membranes sont préhybridées dans le tampon d'hybridation pendant 15 mn à 65°C. La sonde dénaturée est rajoutée dans le tampon à raison de 10^6 cpm/ml.

L'hybridation est réalisée à 65°C pendant la nuit.

Après hybridation, les membranes sont lavées :

- 2 fois 10 mn à 65°C avec 2 x SSPE, 0,1% SDS
 - 1 fois 15 mn à 65°C avec 1 x SSPE, 0,1% SDS
 - 2 fois 15 mn à 65°C avec 0,7 x SSPE, 0,1% SDS
- (20 x SSPE : NaCl 3,6 M ; NaH₂ PO₄ 0,2 M ; EDTA 0,02 M)

Les membranes sont soumises à une autoradiographie de 12 heures à -80°C avec un film XRAY, (FUJI).

A l'issue de l'hybridation un clone positif appelé pG4 a été obtenu. Le plasmide a été extrait de ce clone par miniprep (MANIATIS, 1989, référence précitée) et analysé par digestion par des enzymes de restriction. Le plasmide pG4 contient un insert d'ADN de *L. casei* de 3,5 kb.

La production de lactate dans *E. coli* a été déterminée pour le clone pG4. Après croissance de pG4 dans 10 ml de LB contenant 1% de glucose et de l'ampicilline (50 mg/ml), à 37°C, une production de lactate a été mise en évidence par dosage enzymatique à l'aide du kit L.lactate (BOEHRINGER).

Ceci confirme que le gène de L.LDH de *L. casei* est présent en entier sur le fragment de 3.5 kb isolé.

EXEMPLE 2. - MODIFICATION DU GENE PAR MUTAGENÈSE

La séquence du gène LDH de *L. casei* a été récemment publiée [KIM et al., Appl. Environ. Microbiol. 57:2413-2417, (1991)].

Il a été vérifié que la carte de restriction déduite de la séquence publiée était identique à celle d'un fragment central de l'insert de 3.5 kb du plasmide pG4.

Le codon d'initiation de la traduction du gène LDH de *L. casei* étant GTG, codon non utilisé par *Saccharomyces cerevisiae* comme codon d'initiation, GTG a été remplacé en ATG par mutagénèse.

La stratégie de mutagénèse détaillée est résumée sur la figure 1.

1. Obtention du fragment mutagénéisé

L'insert de 3.5 kb contenu dans le plasmide pG4 est indiqué sur la figure 1, ainsi que la région codante du gène LDH (codon start GTG, codon stop TAA).

Le remplacement du GTG en ATG a été effectué par amplification PCR d'un fragment 5' du gène à partir du plasmide pG4 et à l'aide de deux amorces, dont la position et la séquence sont indiquées sur la figure 1 :

- L'amorce 1 est constituée de 13 bases complémentaires de la région codante en 5' et de 9 bases différentes : l'une étant un A de manière à remplacer le GTG en ATG, les 8 autres permettant la création d'un site XhoI en 5' du codon d'initiation.

- L'amorce 2 est constituée de 22 bases complémentaires d'une région interne à la région codante, comprenant le site BglII présent dans le gène.

Ces 2 amorces permettent l'amplification d'un fragment de 335 bases.

L'amplification a été réalisée de la manière

suivante :

- | | | |
|---|----------------|------------------|
| | Amorce 1 | 4 µl (20 pmoles) |
| | Amorce 2 | 4 µl (20 pmoles) |
| 5 | Taq Buffer 10x | 10 µl |
| | Taq 5u/µl | 0,5 µl |
| | dNTP (2 mM) | 10 µl |
| | pG4a | 10 µl 100 ng |
| | Eau | 70,5 µl |
- 10 Conditions d'amplification : 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 1 mn à 72°C pendant 30 cycles.

La taille du fragment d'amplification a été vérifiée (335 bases) par analyse d'un aliquot sur gel d'agarose 1,5%.

- 15 1,5 µl du produit d'amplification ont été digérés par XhoI-BglIII et le fragment digéré a été sous-cloné dans le plasmide pBSLDH₃ comme décrit ci-dessous (2.b).

2. Reconstruction du gène

- 20 Les différentes étapes de cette construction sont schématisées sur la figure 2.

a) Construction du plasmide pBSLDH₃

- Le fragment XbaI (2,2 kb) limité par un site en aval du codon stop TAA et un site dans le polylinker
25 du plasmide pG4 a été isolé, par digestion XbaI de pG4, séparation des fragments sur gel d'agarose à bas point de fusion NIUSIEVE (FMC), et découpe de la bande de 2,2 kb.

- Ce fragment a été sous cloné dans le plasmide pBS (pBluescript II SK+, STRATAGENE) par ligation de
30 200 ng de fragment XbaI (dans NIUSIEVE chauffé à 65°C) à 50 ng de plasmide pBS digéré par XbaI et déphosphorylé. Le plasmide recombinant obtenu est dénommé pBSLDH₃.

b) Introduction du fragment modifié

- Le plasmide pBSLDH₃ a été digéré par BglIII
35 (dans la région codante) et XhoI (site du polylinker), puis déphosphorylé.

100 ng de fragment amplifié par PCR et digéré par BglII- XhoI (comme indiqué en 1 ci-dessus), ont été ligués à 50 ng de pBSLDH₃ ainsi traité.

Le plasmide pBSLDH*₁ obtenu possède la région
5 codante du gène LDH reconstituée, avec un codon ATG comme codon d'initiation, limitée par un site XhoI immédiatement en amont de l'ATG et par un site XbaI immédiatement en aval du codon stop TAA.

Le fragment XhoI-BglII de ce plasmide a été
10 séquencé afin de vérifier d'une part le remplacement du GTG en ATG et d'autre part qu'aucune erreur n'a été commise par la Taq polymérase lors de l'amplification.

EXEMPLE 3. - INTRODUCTION DU GÈNE MODIFIÉ DANS DES VECTEURS D'EXPRESSION

15 Afin d'obtenir une expression du gène LDH de *L. casei* mutagénisé dans la levure, la région codante comprenant le codon ATG créé a été placée sous contrôle d'éléments régulateurs de levure, dans un vecteur navette levure/*E. coli*.

20 1) Introduction du gène LDH sur le plasmide multicopie pVT100-U (Figure 3)

Le plasmide d'expression qui a été utilisé est le plasmide pVT100-U contenant l'origine 2 μ , le marqueur URA3 et les éléments régulateurs forts ADH (promoteur et
25 terminateur) ainsi que les éléments bactériens (origine et gène de résistance à l'ampicilline).

Ce plasmide a été décrit par VERNET et al. [Gene 52:225-233, (1987)].

Le fragment XhoI-XbaI du plasmide pBSLDH*₁ a
30 été isolé par digestion XhoI-XbaI et séparation des fragments sur gel d'agarose à bas point de fusion NUSIEVE. Le fragment XhoI-XbaI (1 kb) correspondant au gène a été découpé.

100 ng de ce fragment ont été ligués à 50 ng
35 de vecteur pVT-100-U digéré par XbaI et XhoI (sites présents dans le polylinker), et déphosphorylé.

Le vecteur recombinant pVT-100-ULDH* a été obtenu.

2) Introduction du gène LDH dans le plasmide monocopie YCp50 (Figure 4)

5 Le plasmide monocopie centromérique YCp50 a été décrit par ROSE [S.L. BERGER and A.R. KIMMEL (Ed), Academic Press, 481-504 (1987)].

Ce vecteur porte une séquence ARS et une séquence centromérique et le marqueur URA3, ainsi que les
10 éléments bactériens (origine de répllication et résistance à l'ampicilline).

Le fragment SphI de pVT 100-U-LDH* contenant la cassette d'expression pADH-LDH*-tADH a été isolé par digestion SphI et séparation des fragments sur gel d'aga-
15 rose à bas point de fusion NIUSIEVE. Le fragment SphI contenant la cassette d'expression (1,7 kb) a été découpé. 100 ng de ce fragment ont été ligués à 50 ng de vecteur YCp50 digéré par SphI et déphosphorylé. Le vecteur recombinant YCp50-LDH* a été obtenu.

20 **EXEMPLE 4 - TRANSFORMATION DE LA LEVURE**

La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* SCV5M a été transformée par le plasmide pVT100-U-LDH* d'une part, et le plasmide YCp50-LDH* d'autre part .

La souche SCV5M a été déposée le 18 Juin 1992
25 auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, tenue par l'Institut Pasteur, sous le numéro I-1222. Il s'agit d'une souche de laboratoire haploïde, auxotrophe pour l'uracile (ura3), MAT a, dérivée d'une souche oenologique. Cette souche est capable de
30 développer une fermentation en conditions oenologiques comparable à celle des souches industrielles.

La méthode de transformation utilisée est celle de l'acétate de lithium décrite par GIETZ et SCHIESTL [Yeast, 7:253-263, (1991)].

35 Le milieu sélectif utilisé est du YNB (Yeast nitrogen base 7 g/l DIFCO, glucose 20 g/l). L'absence

d'uracile permet de conserver une pression de sélection pour le plasmide.

EXEMPLE 5 - ESSAIS DE FERMENTATION

1) Plasmide multicopie pVT100-U-LDH*

5 Les essais de fermentation ont été réalisés avec les souches suivantes :

- V5/pVT100-U : souche SCV5M transformée par le plasmide pVT100-U sans insert, à titre de témoin.
 - V5/pVT100-U-LDH* : souche SCV5M transformée
- 10 par le plasmide multicopie pVT100-U contenant le gène LDH modifié. Plusieurs transformants ont été testés séparément.

Les fermentations ont été réalisées sur milieu synthétique minimum YNB (yeast nitrogen base 7 g/l DIFCO)

15 contenant 50 g/l de glucose, et tamponné à pH 5.1 par 6.3 g/l d'acide citrique et NaOH.

Des précultures des souches V5/pVT100-U et V5/pVT100-U-LDH* ont été réalisées pendant 20 heures dans 10 ml de milieu à 28°C.

20 Les cultures ont été réalisées dans 50 ml, par ensemencement de 7×10^5 cellules/ml à partir des précultures. Le nombre de cellules a été déterminé sur un appareil de type COULTER COUNTER modèle ZBI.

Les cultures ont été incubées à 28°C, avec une

25 agitation intermittente par barreau aimanté.

Le pH initial a été mesuré : 5 pour V5/pVT100-U et 4.9 pour V5/pVT100-U-LDH*.

Des prélèvements de 1 ml ont été réalisés à intervalles réguliers pour déterminer :

- 30
- le nombre de cellules, par comptage cellulaire (COULTER COUNTER) ;
 - le pH du milieu de culture ;
 - la concentration du milieu de culture en glucose, en éthanol et en lactate, par dosage enzymatique
- 35 (kits de dosage BOHRINGER ;
- l'activité spécifique lactate-

déshydrogénase ; cette activité a été déterminée sur des extraits bruts de cellules obtenus comme suit : 10^8 cellules sont prélevées, centrifugées 5 minutes à 6000 rpm, et lavées dans 5 ml de tampon acétate 80 mM pH 5.5
5 (Tampon acétate 0.2M:Na acétate 2,73 g, dans 100 ml d'eau ; pH 5.5 avec de l'acide acétique). Le culot cellulaire est repris dans 0.5 ml du même tampon. Les cellules sont broyées sur vortex à l'aide de billes de verre, 4 fois 1 minute, au froid. Le broyat est
10 centrifugé 5 minutes à 15000 rpm, et le surnageant récupéré est utilisé comme extrait brut. Le dosage de la LDH est réalisé comme décrit par HENSEL et al., [Arch. Microbiol. 112, 81-93 (1977)]. L'activité LDH est exprimée en U/mg de protéines de l'extrait

15 Les résultats des dosages effectués sont les suivants :

- Production d'éthanol et de lactate :

La production de lactate de V5/pVT100-U-LDH* varie, selon les transformants testés, entre 6 et 25 g/l
20 de lactate, avec une quantité produite de l'ordre de 10 g/l pour la majeure partie d'entre eux ; les résultats expérimentaux détaillés ci-après et illustrés par la figure 5 ont été obtenus réalisées avec un transformant V5/pVT100-U-LDH* produisant environ 10 g/l de lactate.
25 Alors que la souche témoin produit de l'éthanol mais ne montre pas de production détectable de lactate (fig. 5D), le transformant produit simultanément du lactate et de l'éthanol (fig. 5C), ce qui correspond approximativement à la dégradation de 25 à 30% du glucose présent dans le
30 milieu de culture en lactate.

La production simultanée de lactate et d'éthanol est, de plus, mise en évidence pendant toute la phase exponentielle de croissance et au début de la phase stationnaire. Au cours de la phase stationnaire, la
35 production de lactate s'arrête.

- Croissance cellulaire :

La croissance du transformant V5/pVT100-U-LDH* (fig. 5 A) est comparable à celle de la souche témoin (fig. 5B). L'arrêt de la croissance (apparition de la phase stationnaire) se produit toutefois plus tôt pour la souche transformée que pour le témoin, et le nombre final de cellules est inférieur d'environ 20% à celui observé pour la souche témoin.

- Mesure du pH du milieu de culture

L'arrêt de la croissance peut être expliqué par l'acidification importante du milieu de culture. On observe en effet une baisse de pH beaucoup plus forte dans le cas de la souche transformée (fig. 5A) que dans le cas de la souche témoin (fig 5B). Cette acidification importante est parfaitement corrélée à la production de lactate observée.

- Dosage de l'activité LDH :

Les résultats obtenus sur l'extrait brut de la souche transformée (fig. 5E) montrent que l'activité spécifique de la LDH est maximale quand les cellules entrent en phase stationnaire, puis diminue au cours de cette même phase.

- Autres milieux de culture :

Les résultats obtenus sur milieu YNB ont en outre été confirmés sur jus de raisin (185 g/l glucose) et jus de pomme (93 g/l glucose).

L'obtention d'une production mixte lactate-éthanol peut donc être réalisée sur différents milieux (synthétiques, minimum ou complets, naturels) contenant des concentrations, en glucose variable, et quel que soit le pH de départ. La gamme de température utilisable est celle permettant la croissance des levures (approximativement 14-35°C).

2) Plasmide monocopie YCp50-LDH*

Des essais de fermentation ont été réalisés avec la souche V5/YCp50-LDH* sur milieu YNB contenant

50 g/l de glucose tamponné à pH 5.1. Une production de lactate de l'ordre de 1 g/l a été obtenue pour cette souche.

L'activité spécifique de la LDH, déterminée
5 comme précédemment décrit, présente des variations
similaires à celles observées avec les transformants
multicopie. Par contre, l'activité maximale, observée en
fin de phase exponentielle-début de phase stationnaire,
est de l'ordre de 1.5 U/mg protéines, soit 7 fois moins
10 que l'activité maximale obtenue avec le transformant
multicopie (10 U/mg prot).

La production de lactate par le transformant
monocopie est donc en corrélation avec le niveau
d'activité spécifique de la LDH.

15 Ceci montre que la production de lactate peut
être modulée notamment en fonction du nombre de gènes LDH
introduits dans la levure.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède,
l'Invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de
20 mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui vien-
nent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en em-
brasse au contraire toutes les variantes qui peuvent
venir à l'esprit du technicien en la matière, sans
s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente
25 Invention.

REVENDICATIONS

1) Souches de levure caractérisées en ce qu'elles contiennent au moins une copie d'un gène codant pour une LDH de bactérie lactique, sous contrôle de séquences régulant l'expression dudit gène dans la levure.

2) Souches selon la Revendication 1, caractérisées en ce que lesdites levures appartiennent au genre *Saccharomyces*.

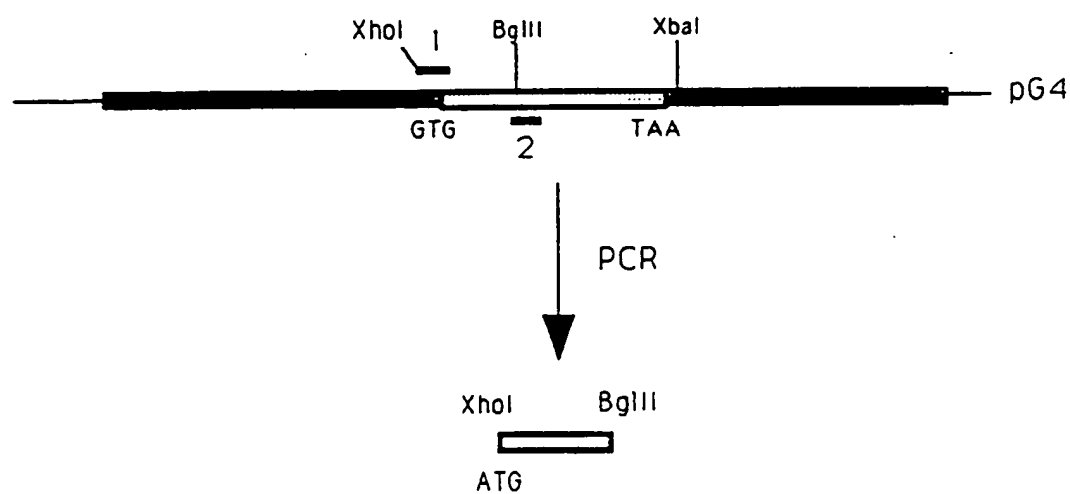
10 3) Souches selon l'une quelconque des Revendications 1 ou 2, caractérisées en ce que le gène exprimé est celui de la LDH de *Lactobacillus casei*.

4) Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comprend le gène d'une LDH de bactérie lactique associé à des séquences de régulation actives dans la levure.

15 5) Vecteurs d'expression, caractérisés en ce qu'ils comprennent une cassette d'expression selon la Revendication 4, et utilisables pour l'obtention des souches de levure transformées selon la Revendication 1.

20 6) Vecteurs selon la Revendication 5, caractérisés en ce qu'il s'agit de vecteurs navette, possédant également une origine de répllication bactérienne et un marqueur de sélection dans une bactérie.

1/5



		XhoI	
PRIMER 1	5' -	GGCTCGAGAT <u>GG</u> CAAGTATTAC- 3'	
L. casei	5' -	GATATCACCG <u>GTGG</u> CAAGTATTAC- 3'	
		BglII	
L. casei	5' -	TGAAGATCTTGAAGTCCATTGT -3'	
PRIMER 2	5' -	ACAATGGACTTCAAGATCTTCA -3'	

Figure 1

2/5

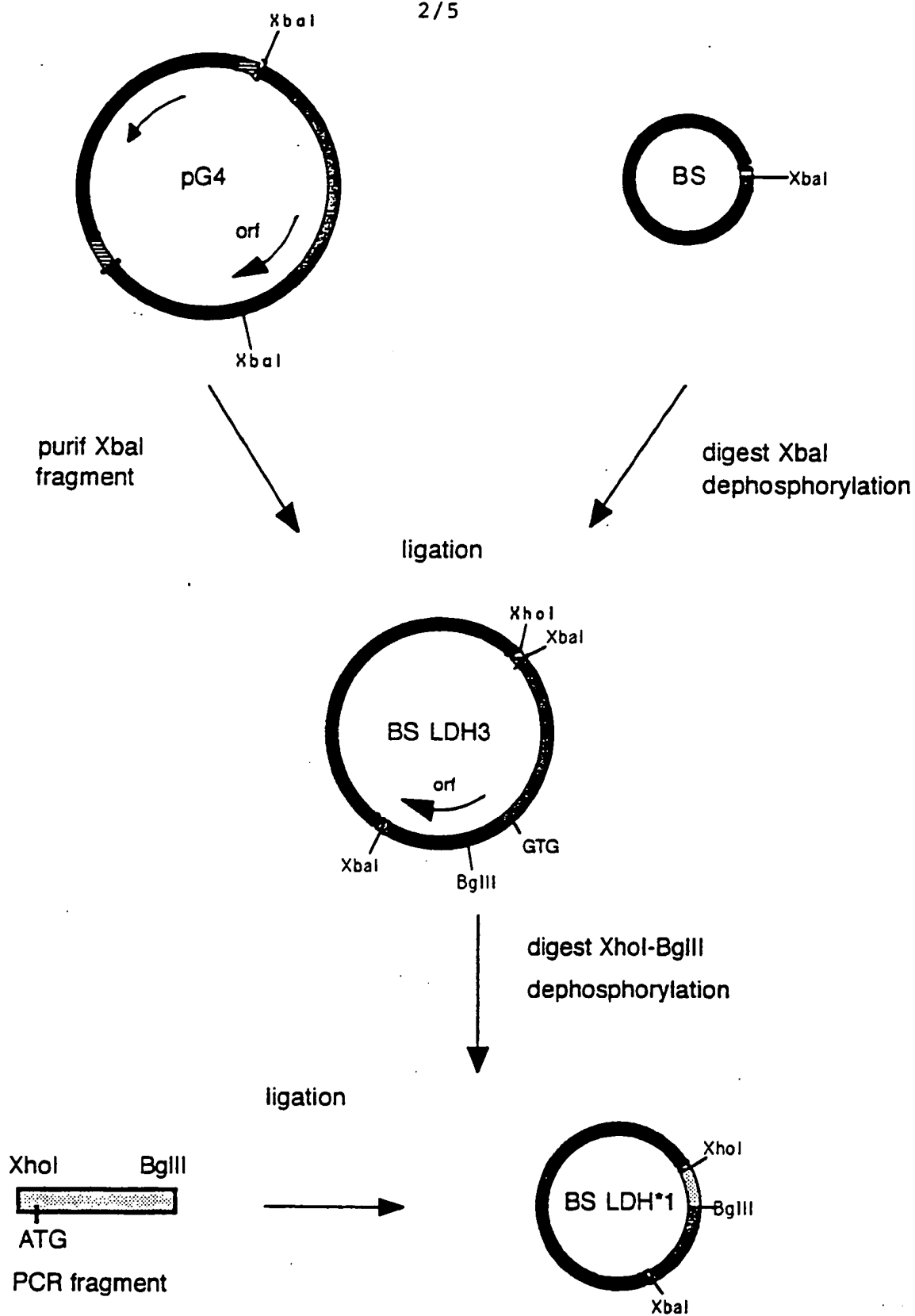


Figure 2

3/5

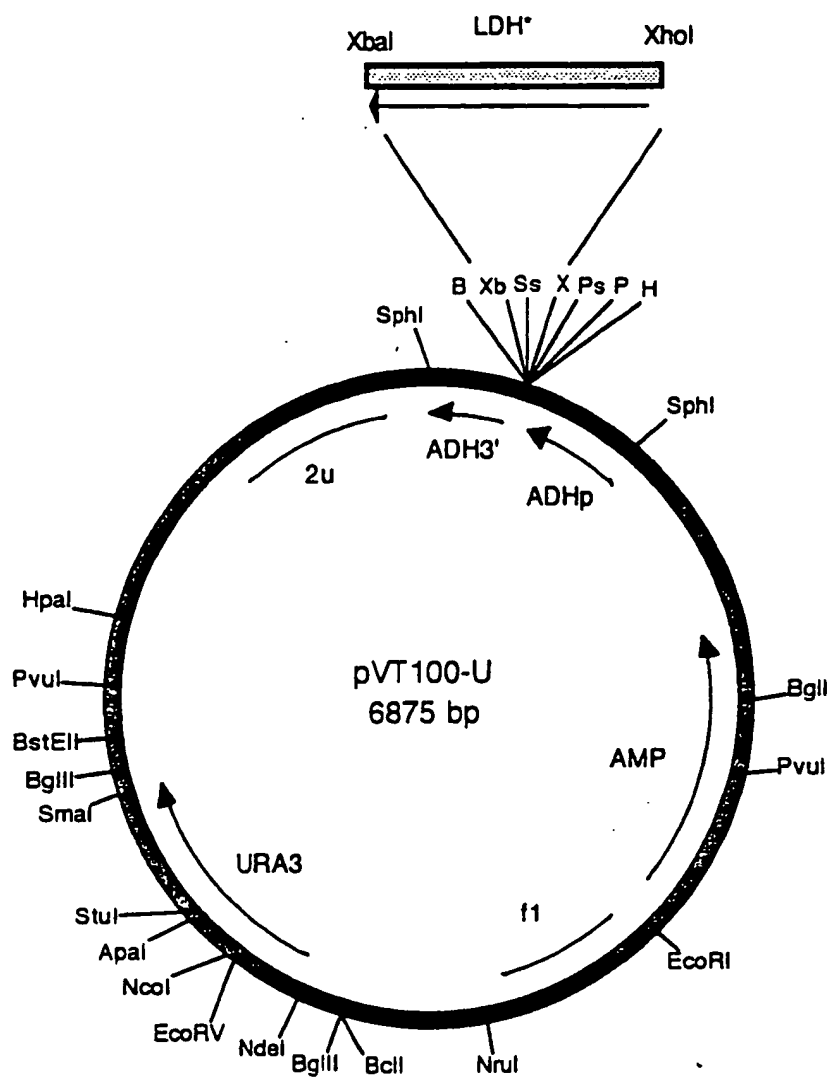


Figure 3

4 / 5

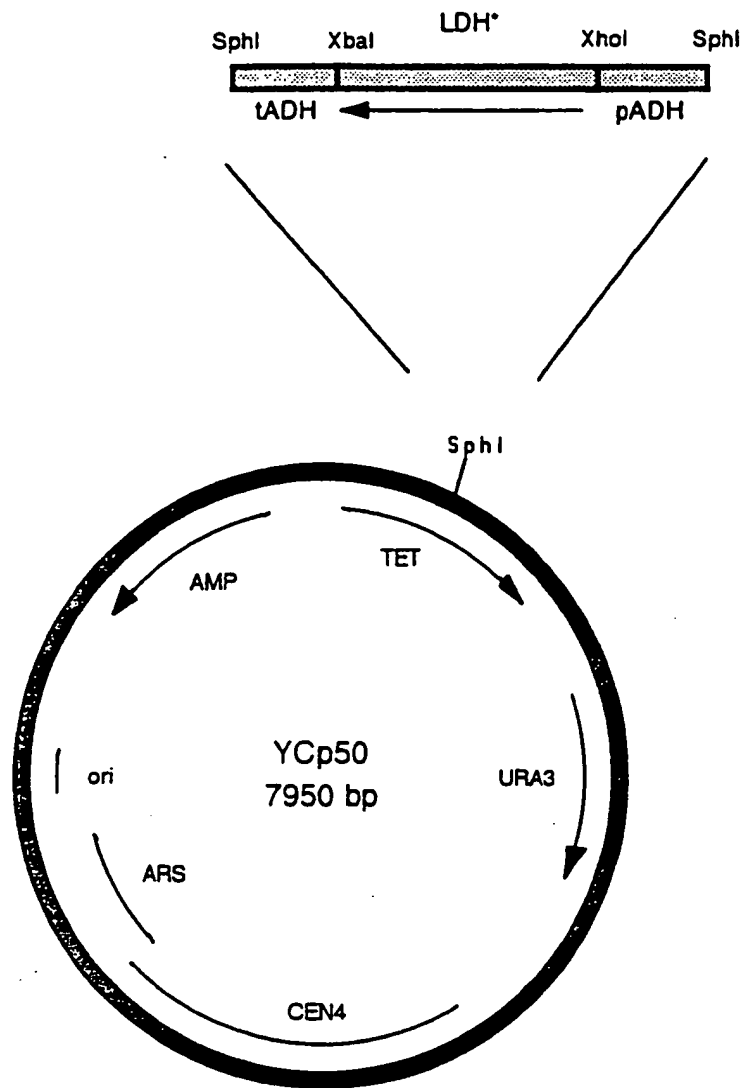


Figure 4

5 / 5

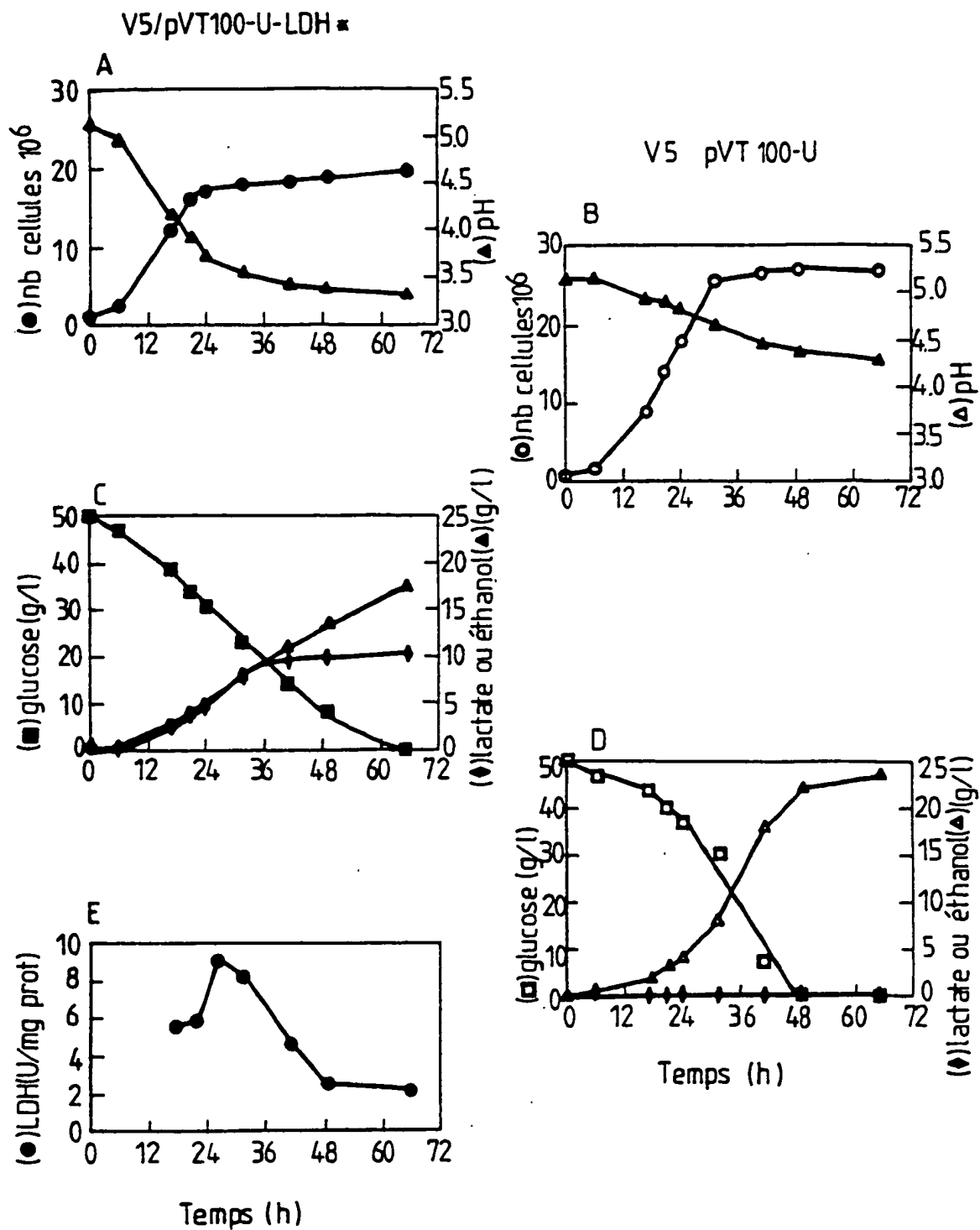


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00618

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁵ C12N C12P C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ^o	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol.57, No. 8, August 1991, pages 2413-2417, Washington DC, US, S.F. KIM et al.: "Cloning and Nucleotide Sequence of the Lactobacillus casei Lactate Dehydrogenase Gene", the whole document (cited in the application)	1,4,5
A	idem	3
Y	EP,A,0103399 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 21 March 1984, page 5, line 1 - page 7, line 34, claims 1-11	1,4,5
A		2,6
A	DATABASE WPIL, Derwent Publications Ltd., London, GB, DATABASE WPIL, AN 91-373410, week 9151, & JP - A - 3251172 (MEIJI MILK PRODS KK) 08 November 1991, abstract	1,4,5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 October 1993 (04.10.93)

Date of mailing of the international search report

20 October 1993 (20.10.93)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

FR 9300618
SA 75616

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0103399	21-03-84	US-A- 4472502	18-09-84

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous)		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
Int.C1.5	C 12 N	C 12 P C 12 R
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, ¹¹ des passages pertinents ¹²	No. des revendications visées ¹⁴
Y	APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 57, no. 8, August 1991, pages 2413-2417, Washington DC, US, S.F. KIM et al.: "Cloning and Nucleotide Sequence of the Lactobacillus casei Lactate Dehydrogenase Gene", le document en entier (cited in the application)	1,4,5
A	idem	3
Y	EP,A,0103399 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 21 mars 1984, page 5, ligne 1 - page 7, ligne 34, revendications 1-11	1,4,5
A	-/-	2,6
<p>⁹ Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
04-10-1993	20-10-1993	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	A. DE KOK	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁶(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUEES SUR LA
DEUXIEME FEUILLE)

Catégorie *	Identification des documents cités, ¹⁶ avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
A	DATABASE WPIL, Derwent Publications Ltd., London, GB, DATABASE WPIL, AN 91-373410, week 9151, & JP - A - 3251172 (MEIJI MILK PRODS KK) 8 novembre 1991, abrégé -----	1, 4, 5

FR 9300618
SA 75616

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 13/10/93.
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A- 0103399	21-03-84	US-A- 4472502	18-09-84
